

attach to #9

BJ

Applicant: Chen *et al.*

U.S. Serial No.: 09/204,865

Filing Date: December 3, 1998

Attorney Docket No.: 9584-0006-999

CA1 - 245466.1

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: C12M 3/06, 3/08, C12N 15/10, C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/18851 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Juli 1995 (13.07.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/00037 (22) Internationales Anmeldedatum: 5. Januar 1995 (05.01.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 00 255.6 7. Januar 1994 (07.01.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BASTIAN, Helge [DE/DE]; Am Webersbüschken 22, D-40822 Mettmann (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Bahnhofsvorplatz 1 (Deichmannhaus), D-50667 Köln (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	

(54) Title: PROCESS FOR REDUCING HIGH-MOLECULAR STRUCTURES

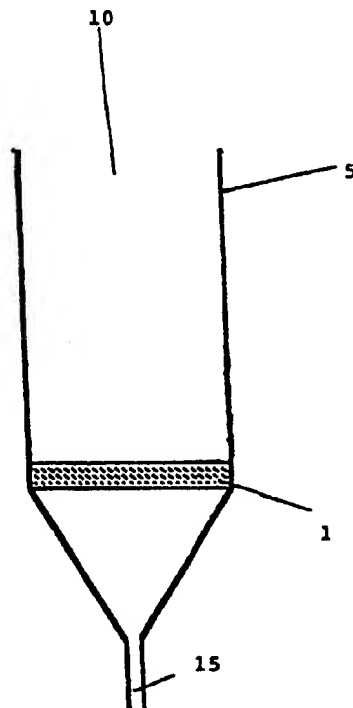
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ZERKLEINERN VON HOCHMOLEKULAREN STRUKTUREN

(57) Abstract

A process for reducing high-molecular structures, especially high-molecular nucleic acid structures in samples, in which the high-molecular structures to be reduced pass through a device having at least one porous layer, the pore size of which becomes smaller in the direction of passage of the structures to be reduced, viewed through the porous layer.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zum Zerkleinern hochmolekularer Strukturen, insbesondere hochmolekularer Nucleinsäurestrukturen in Proben, wobei die zu zerkleinernden hochmolekularen Strukturen eine Einrichtung passieren, die mit mindestens einer porösen Schicht versehen ist, deren Porengröße in Passierichtung der zu zerkleinernden Strukturen, durch die poröse Schicht gesehen, abnimmt.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zum Zerkleinern von hochmolekularen Strukturen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Zerkleinerung von hochmolekularen Strukturen gemäß Anspruch 1, eine Vorrichtung gemäß Patentanspruch 7 sowie Verwendungen der Vorrichtung gemäß Ansprüchen 12 bis 15.

Ausgangspunkt vieler biologischer Isolationsverfahren sind beispielsweise Zell- und Gewebelysate, die häufig sehr viskose Systeme darstellen. Aufgrund ihrer hohen Viskosität sind diese Systeme kaum weiterbearbeitbar und werden üblicherweise verschiedenen Verfahren zur Homogenisierung oder Verringerung der Viskosität unterzogen.

Insbesondere bei der Isolierung von mRNA ist es notwendig, die diese Substanzen enthaltenden Proben zu homogenisieren mit dem Ziel nicht-viskose Lysate oder Lösungen zu erhalten. Die Herstellung von homogenen Zell-Lysaten oder Lösungen mit geringerer Viskosität ist bei einer Reihe molekularbiologischer Techniken notwendig. Beispielhaft seien im folgenden einige dieser Techniken genannt.

Die direkte Isolierung von Gesamt-RNA oder mRNA aus Zell- oder Gewebelysaten erfordert in den meisten Fällen einen Homogenisierungsschritt, da die Hybridisierungsrate zwischen dem zur mRNA Isolierung notwendigen oligo-dT Matrix (z.B.

Cellulose, paramagnetische Partikel oder Latexpartikel) in hochviskosen Lösungen, im Gegensatz zu homogenen Lösungen, sehr niedrig ist. Die entsprechenden Matrices können dabei mit der in der Probe ebenfalls vorhandenen hochmolekularen DNA quasi verkleben und eine Reinigung soweit erschweren, daß sie in manchen Fällen sogar unmöglich wird.

Schließlich ist bei der Präparation von Gesamt-RNA, wie z.B. in P 43 21 904 beschrieben, die zur chromatographischen Aufreinigung notwendige und in eine Apparatur eingesetzte Membran durch hoch-viskose Lysate oder Lösungen schnell verstopft.

Die Protokolle für eine direkte mRNA Isolierung, wie sie im Stand der Technik bekannt sind unter Verwendung bekannter Produkte, gehen davon aus, daß eine Homogenisierung der Proben, die die genannten Substanzen enthalten, unbedingt erforderlich ist.

Es hat sich beispielsweise gezeigt, daß in der Polymerase-Chain-Reaction (PCR) mit genomischer DNA bessere Ergebnisse erzielt werden, wenn gescherte, niedermolekulare DNA eingesetzt wird. Dies könnte damit zusammenhängen, daß kleinere DNA Fragmente leichter denaturierbar sind und so die Hybridisierung des Primers (Primer-Annealing) effizienter ist. In diesem Zusammenhang ist bedeutsam, daß, bei Präparationen von Nucleinsäuren (mRNA, Gesamt-RNA und DNA) für die PCR-Reaktion, Cross-Kontaminationen mit Nucleinsäuren zwischen gleichzeitig oder nacheinander aufgearbeiteten Proben sowie Cross-Kontaminationen mit Nucleinsäuren aus anderen Quellen unbedingt vermieden werden müssen, da die PCR-Reaktion äußerst empfindlich ist, so daß auch Verunreinigungen mit nicht gewünschter Nucleinsäure entsprechend amplifiziert werden würden.

Im Stand der Technik werden zur Homogenisierung bzw. Scherung von Geweben, Zellen und/oder hochmolekularen Stoffen ent-

haltenden Lösungen im wesentlichen die folgenden Methoden angewandt.

Die Zerkleinerung (Scherung) der hochmolekularen DNA kann durch mechanisches Zerkleinern einer in flüssigen Stickstoff-tiefgefrorenen Probe mittels Pistill und Mörser erfolgen. Auch durch mehrmaliges Aufziehen der Probe mit hochmolekularer DNA durch eine Kanüle in eine Spritze, wird die DNA geschert. Diese Methoden sind neben ihrem hohen Arbeitsaufwand auch nicht geeignet, ein sauberes Arbeiten zu garantieren. So erweist sich der Homogenisierungsprozeß zur Isolierung von Biomolekülen aus potentiell infektiösem Ausgangsmaterial, wie menschliche Zell- und/oder Gewebeproben (Biopsiematerial), als gefährlichste Quelle für eine Kontamination des Versuchsdurchführenden, da das Homogenat bei der konventionellen Homogenisierung über eine beträchtliche Distanz spritzen kann.

Die Extraktion von Nucleinsäuren und anderen Biomolekülen aus pflanzlichen Materialien erweist sich aufgrund des hohen Gehalts an Polysacchariden, Polyolen und/oder anderen sekundären Metaboliten als äußerst schwierig, da die genannten Substanzen nach Aufschluß der Zellen oder Gewebe in den üblicherweise verwendeten Lösungen hochviskose Lysate oder gallertartige Strukturen ausbilden. Einfaches Abzentrifugieren der gallertartigen Masse führt in den meisten Fällen nicht zum Erfolg, da eine Trennung von der verwendeten Lösung nicht erreicht werden kann. Die gallertartigen Strukturen und die hohe Viskosität verhindern eine effiziente Isolierung von Nucleinsäuren bzw. machen sie teilweise unmöglich.

Auch spezielle Homogenisatoren wie die handelsüblichen Ultraturrax, Polytron, Omni, Tissuemizer u.ä. können zur Scherung von hochmolekularer DNA eingesetzt werden. Diese Methode ermöglicht zwar ein einfaches und schnelles Homogenisieren praktisch jeder Probe, nachteilig ist allerdings, daß zur Homogenisierung sehr kleiner Zell-, Gewebe- oder Lösungs-

mengen, die insbesondere nachfolgend zur Analyse mittels PCR oder RT-PCR vorgesehen sind, spezielle Mini-Generatoren angeschafft werden müssen. Um Cross-Kontaminationen zwischen verschiedenen Zell- oder Gewebeproben oder anderen Proben zu vermeiden, können dann auch miniaturisierte Einmal-Generatoren verwendet werden, wobei jedoch vorausgesetzt werden muß, daß ein relativ aufwendiges Gerät zum Homogenisieren bereits vorhanden ist. Die miniaturisierten Einmal-Generatoren selbst sind darüber hinaus sehr kostenintensiv.

Eine weitere Methode zur Homogenisierung, die sich für einige Anwendungen bewährt hat, ist eine Ultraschallbehandlung der betreffenden Probe. Dabei ist auf dem angesprochenen Gebiet, beispielsweise der PCR-Anwendung, teures Gerät erforderlich. Nachteilig ist ebenfalls, daß Einmal-Ultraschallköpfe nicht erhältlich sind. Es besteht darüber hinaus die Gefahr, daß die Nucleinsäuren durch die Ultraschallbehandlung zu stark fragmentiert werden bis zur völligen Unbrauchbarkeit für die weiteren Analyse-Methoden.

Die DE 41 39 664 A1 betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren. Die Vorrichtung zur Durchführung des beschriebenen Verfahrens besteht aus einem Hohlkörper mit einer Einlaßöffnung und einer Auslaßöffnung, wobei im Hohlkörper zwischen zwei Fixiereinrichtungen ein pulverförmiges erstes Material auf Silicagelbasis angeordnet ist und ein zweites Material zwischen dem ersten und der Auslaßöffnung angeordnet ist, wobei die ersten und zweiten Materialien unterschiedliche Adsorptionscharakteristika für Nucleinsäuren aufweisen.

Die DE 40 34 036 betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus Zellsuspensionen. Die Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens weist eine zellenaufnehmende Matrix in einem Hohlkörper zwischen zwei porösen Einrichtungen auf. Die Porengröße der Einrichtungen

ist größer als die Hohlraumgröße des die Matrix bildenden Materials.

CLONTECH Labs 1993, "Nucleic Acid Purification with CHROMA SPIN Columns", betrifft ein Verfahren zur Extraktion von Nucleinsäuren aus Agarosegelstücken.

In D. Blöcher und G. Iliakis, Int. J. Radiat. Biol., 1991, Vol. 59, 919 - 926, werden DNA-Fragmente von einem Filter entfernt während einer nicht denaturierenden Filterelution. Dabei scheinen DNA-Stücke an der Filtermembran abgebaut zu werden.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem besteht demnach darin, ein Verfahren anzugeben, das die genannten Nachteile des Standes der Technik vermeidet. Es soll ein Verfahren bereitgestellt werden, das es in einfacher und kostengünstiger Weise ermöglicht, eine effiziente und cross-kontaminationsfreie Präparation von Nucleinsäuren und generell eine Homogenisierung von viskosen Systemen zu erreichen.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1. Die sich daran anschließenden Unteransprüche 2 bis 6 betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die Patentansprüche 7 bis 11 betreffen die für das erfindungsgemäße Verfahren besonders geeignete Vorrichtung. Die Ansprüche 12 bis 15 betreffen die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Zerkleinerung von hochmolekularen Strukturen insbesondere hochmolekularer Nucleinsäuren geht davon aus, daß das die zu zerkleinernden Strukturen enthaltende System auf einer Einrichtung ange-

ordnet wird. Diese Einrichtung weist mindestens eine poröse Schicht auf. Die poröse Schicht weist dabei eine asymmetrische Verteilung ihrer Porengröße auf. Die Porengröße nimmt dabei in Passierrichtung der zu zerkleinernden Strukturen, durch die poröse Schicht gesehen, ab. Der Begriff Porengröße ist als mittlere Porengröße zu verstehen. Das die zu zerkleinernden hochmolekularen Strukturen enthaltende System passiert die Einrichtung, wobei während der Passage die hochmolekularen Strukturen, vermutlich aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegen mechanische Einwirkungen, zerkleinert werden. Das die zu zerkleinernden hochmolekularen Strukturen enthaltende System kann insbesondere ein relativ hoch viskoses System sein, das aus einem Zell- und/oder Gewebelysat besteht oder eine zur Trennung von Nucleinsäuren verwendete Matrix, wie Polyacrylamidgele, oder Weichgewebe (Brüstgewebe, Hirn, Fettgewebe u. ä.), oder Lösungen, die hochmolekulare DNA enthalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in vorteilhafter Weise auch zur Homogenisierung von inhomogenen viskosen Systemen, insbesondere Zell- und Gewebelysaten, verwendet werden, wenn die oben beschriebene Einrichtung mindestens zwei poröse Schichten aufweist. Das die zu zerkleinernden hochmolekularen Strukturen enthaltende oder zu homogenisierende viskose System passiert die Einrichtung mit mindestens zwei porösen Schichten, wobei die Porengröße der porösen Schicht in Passierrichtung des zu homogenisierenden Systems gesehen abnimmt. Die Porengröße der in Passierrichtung gesehenen ersten Schicht kann bis zum 6-fachen der Porengröße der darunterliegenden zweiten Schicht betragen. Die zweite Schicht besitzt eine Mindestporengröße, die im wesentlichen dadurch bestimmt ist, daß eine Verstopfung der zweiten Schicht durch die zu zerkleinernde oder homogenisierende Schicht unterbleibt. Typischerweise ist die Porengröße der zweiten Schicht $> 10 \mu\text{m}$. Damit kann auch eine zur Trennung von Nucleinsäuren oder Proteine verwendete Matrix, wie Polyacrylamidgele, zerkleinert bzw. homogenisiert werden.

Der Vorgang kann mehrfach wiederholt werden, wenn sich zeigt, daß keine hinreichende Scherung nach einmaliger Passage erreicht wurde. Es versteht sich, daß das erfindungsgemäße Verfahren ebenso dahingehend abgewandelt werden kann, daß die Passierstrecke für die zu zerkleinernde Struktur verlängert wird, indem die Dicke der verwendeten porösen Schicht oder Schichten variiert wird.

Zellen- und/oder Gewebe können gegebenenfalls in Guanidin-thiocyanat-haltigem Puffer oder in einem Proteinase K oder ähnliche Protease enthaltenden Puffer aufgenommen und/oder gegebenenfalls darin inkubiert werden. Die Zellen- oder Gewebestücke können vorher durch mechanische Einwirkung zerkleinert worden sein.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist zur Isolierung von Nucleinsäuren problemlos. Hochviskoses Material wird in dieser Vorrichtung geschert, so daß das Lysat anschließend einfach für die weitere Verarbeitung benutzt werden kann, während Zell- und Gewebereste gleichzeitig aus dem Lysat durch den Filtrationseffekt der Vorrichtung entfernt werden.

Die Passage des viskosen Systems durch die Poren bewirkt überraschenderweise eine Scherung von gegen mechanische Einflüsse empfindlichen Substanzen. Insbesondere wird durch die Passage hochmolekulare Nucleinsäure, wie genomische DNA geschert. Gleichzeitig können durch das erfindungsgemäße Verfahren genomische DNA oder andere hochmolekulare Verbindungen enthaltende Lösungen homogenisiert und hochmolekulare Strukturen wie Polyacrylamidgele zerkleinert werden. Nach der Homogenisierung weisen die entsprechenden Proben eine geringere Viskosität als zu Anfang der Behandlung auf. Die Proben können dementsprechend leichter weiterverarbeitet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Probenaufbereitung zur Isolierung von RNA und DNA. Dabei werden RNA-Moleküle, insbesondere in einem Größenbereich von 0,8 bis 20 Kbp zugänglich. DNA-Moleküle in einer Größe von 40.000 bis 50.0000 bp werden aus Proben erhalten, die DNA als chromosomale DNA enthalten.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das die zu zerkleinernde hochmolekulare Struktur aufweisende System oder das zu homogenisierende System (Probe) auf der Einrichtung mit mindestens einer porösen Schicht angeordnet und auf der Probenseite unter mechanischer Einwirkung durch die mindestens eine poröse Schicht gedrückt. Die Passage kann beispielsweise auf der Probenseite mit mechanischer Einwirkung wie Überdruck oder Schwerkraft, wie sie durch Zentrifugation generiert werden kann, bewirkt werden. Es ist jedoch ebenfalls möglich, auf der der Probe abgewandten Seite einen Unterdruck zu erzeugen, wodurch dann z.B. das zu homogenisierende viskose System die porösen Schichten der Einrichtung passiert.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt in vorteilhafter Weise eine Probenvorbereitung für die PCR-Reaktion (PCR: Polymerase Chain Reaction). Diese Reaktion dient der DNA-Amplifikation. Insbesondere bei Verwendung einer Schicht mit einer Porengröße im Bereich von 20 μm bis 70 μm fällt die DNA überwiegend in Längen von 40 bis 60 kb an, unabhängig davon, ob die DNA direkt aus Zell-Lysaten stammt oder aus vorgereinigten Lösungen. Somit läßt sich die Erfindung in vorteilhafter Weise mit dem in P 43 21 904 beschriebenen Verfahren kombinieren. Auf der porösen Schicht wird eine Nucleinsäure bindende Matrix wie z.B. Glasfasern, angeordnet. Die vorhandene DNA wird dabei unter hohen Ionenstärken auf der Matrix gebunden und bei Elution, mit z.B. Wasser, danach durch Passieren der poröse(n) Schicht(en) geschert (zerkleinert).

Analog ist auch bei der einschichtigen Ausführungsform des Verfahrens vorzugehen.

Die Figur 1 zeigt eine an das erfindungsgemäße Verfahren angepasste Vorrichtung, die ebenfalls gemäß Anspruch 7 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist. Die Vorrichtung weist eine Einlaß- 10 und Auslaßöffnung 15, mit einer im Lumen eines Hohlkörpers 5 angeordneten Einrichtung 1 auf. Die Einrichtung 1 besteht aus einer porösen Schicht, deren Porengröße, in Passierichtung der zu zerkleinernden Strukturen durch die poröse Schicht gesehen, abnimmt. Die poröse Schicht besteht vorzugsweise aus inerten Materialien, wie anorganischen oder organischen Substanzen, insbesondere Glasfritten-ähnliche Materialien oder polymere Substanzen, wie sie auch zum Aufbau von Membranfiltern verwendet werden. Es sind insbesondere Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol und andere polymere Kohlenwasserstoffmaterialien zu nennen, aus denen die poröse Schicht bestehen kann.

Die Figur 2 zeigt eine an das erfindungsgemäße Verfahren angepasste Vorrichtung, die ebenfalls gemäß Anspruch 8 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist. Die weist eine Einlaß- 10 und Auslaßöffnung 15, mit einer im Lumen eines Hohlkörpers 5 angeordneten Einrichtung 1 auf. Die Einrichtung 1 besteht aus mindestens zwei Schichten 2,3 mit in Richtung der Auslaßöffnung 15 abnehmender Porengröße der Schichten 2,3. Durch die Passage des zu homogenisierenden Systems durch die Schichten 2,3 wird diese homogenisiert. Die Schichten sind vorzugsweise in dem insbesondere zylindrisch ausgestalteten Hohlkörper 5 befestigt. Diese Befestigung kann durch Reibung, wie beispielsweise durch Einspannen der Einrichtung 1 mit den Schichten 2,3 oder durch Verkleben mit der insbesondere zylindrischen Hohlraumwandung erfolgen. Die Schichten weisen Porengröße im Bereich von 1 mm bis 10 μ m auf, wobei die Porengröße der jeweiligen Schichten abgestuft ist.

Die Abstufung der Porengröße der Schichten erfolgt dadurch, daß die erste Schicht 2, in Fließrichtung der Probe gesehen, eine bis zum 6-fachen der Porengröße der zweiten Schicht 3 aufweist, wobei deren Porengröße $> 10 \mu\text{m}$ ist. In einer besonderen Anordnung ist die erfindungsgemäße Vorrichtung auf handelsübliche Zentrifugenröhrchen abgestimmt. Die Figur 3 zeigt eine solche Anordnung. Dabei ist ein im wesentlichen zylindrischer Hohlkörper mit an der Auslaßöffnung 15 trichterförmig verjüngend am oberen Ende des Zentrifugenröhrchens so angeordnet, daß die Einlaßöffnung 10 der erfindungsgemäß zu verwendenden Vorrichtung ebenfalls an der Öffnung des Zentrifugenröhrchens 20 angeordnet ist. Die Anordnung kann mittels eines Deckels 25, der entweder an der erfindungsgemäßen Vorrichtung oder an dem Zentrifugenröhrchen selbst angeordnet ist, verschlossen werden. Im Innern der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind fünf Schichten 2,3,4,5,6 vorzugsweise so angeordnet, daß die Schicht mit der jeweils geringeren Porengröße direkt an diejenige mit der größeren Porengröße mit ihren Oberflächen aneinandergrenzt. Nach Passage des viskosen Systems durch die Einrichtung 1 sammelt sich am Boden des Zentrifugenröhrchens 20 die homogenisierte Lösung 30.

In der in Figur 3 gezeigten Anordnung weisen die porösen Schichten beginnend mit der Schicht 2 Porengrößen von ca. $200 \mu\text{m}$, Schicht 3 ca. $75 \mu\text{m}$, Schicht 4 ca. $35 \mu\text{m}$, Schicht 5 ca. $20 \mu\text{m}$ und Schicht 6 ca. $10 \mu\text{m}$ auf. Es versteht sich, daß die Vorrichtung auch mit nur einer porösen Schicht, wie oben beschrieben, eingesetzt werden kann.

Es ist für den Fachmann selbstverständlich, daß eine einstückig ausgeformte Einrichtung, die nicht aus mehreren Lagen aufgebaut ist, als äquivalente Ausführungsform verstanden wird. Wichtig ist dann, daß die in einer einstückigen Version ausgeführte Einrichtung 1 einen Porengrößengradienten, der von einer Oberfläche der Schicht zu der gegenüberliegenden Schicht verläuft, aufweist.

Die erfindungsgemäßen Verwendungen der beschriebenen Vorrichtungen erlauben, daß in einfacher, kostengünstiger Weise viskose Systeme wie beispielsweise Zell- und Gewebelysate homogenisiert werden und in Systeme geringerer Viskosität überführt werden können.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß hochmolekulare Nucleinsäuren aufgrund der Passage durch die in der erfindungsgemäß zu verwendenden Vorrichtung befindlichen Einrichtung gesichert wird, so daß sie für die nachfolgenden molekularbiologischen Prozessierungsschritte leichter und reproduzierbarer weiterverarbeitbar wird. Dies trifft insbesondere für die Aufarbeitung von genomischer DNA, mRNA und Gesamt-RNA/-DNA zu.

Weiterhin hat sich überraschenderweise gezeigt, daß hochmolekulare Strukturen wie Polyacrylamidgele in einfacher Weise zerkleinert werden können, so daß z.B. Nucleinsäuren und/oder Proteine leicht aus einer Trennmatrix isoliert werden können.

In einer anderen Weiterbildung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Einrichtung 1 in einer Spritze (als zylindrischer Hohlkörper 5) angeordnet. Das zu homogenisierende viskose System wird dabei durch die Kanüle in die Spritze gezogen und passiert die in der Nähe der Verbindungsstelle zwischen Kanüle und Spritze angeordnete Einrichtung 1. Ist die Probe in die Spritze gezogen, kann diese durch Herausdrücken erneut die Einrichtung 1 passieren. Gegebenenfalls kann dieser Vorgang mehrfach wiederholt werden, um eine hinreichende Homogenisierung, insbesondere hochviskoser Lösungen enthaltend hochmolekulare Nucleinsäuren, zu gewährleisten. Dabei kann die Schicht mit der größten Porengröße der Kanüle der Spritze zugewandt sein.

In vorteilhafter Weise können durch das erfindungsgemäße Verfahren und/oder die erfindungsgemäße Vorrichtung Nucleinsäuren, wie genomische DNA oder Gesamt-Nucleinsäuren aus den

entsprechenden Matrices isoliert werden, die üblicherweise zur Trennung von Nucleinsäuren eingesetzt werden. Zu nennen sind hierbei insbesondere Polyacrylamidgele, die als Matrix für gelelektrophoretische Trennungen von DNA oder RNA eingesetzt werden. Nach der Elektrophorese werden lediglich die Banden, in welcher sich die Nucleinsäuren bestimmter Größe angereichert haben, beispielsweise durch Stanzen oder Schneiden von den übrigen Gelbestandteilen getrennt und dann durch die erfindungsgemäß zu verwendende Vorrichtung unter Anwendung des erfindungsgemäß beschriebenen Verfahrens passiert. Dabei hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die in der homogenisierten Lösung vorhandenen Restbestände des Gels keine störenden Einflüsse auf die folgenden molekularbiologischen Prozessierungsschritte der Nucleinsäuren zeigt.

Die Erfindung beschreibt somit ein einfaches, sicheres und kostengünstiges Verfahren zur Zerkleinerung und Homogenisierung von viskosen Systemen, insbesondere Zell- und Gewebelysaten oder hochmolekulare Nukleinsäuren enthaltenden Systemen.

Die vorliegende Erfindung wird anhand folgender Beispiele näher erläutert.

Beispiele

Zusammensetzung der in den Beispielen 1 - 3 benutzten Lösungen

- OL: 4 M Guanidin-Isothiocyanat, 25 mM Na-Citrat pH 7.0, 20 mM EDTA pH 8.0
- DB: 25 mM Na-Citrat pH 7.0, 0,20 EDTA pH 8.0, 0,75 % Sarcosin
- OW: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5
- TE: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0

Beispiel 1

Homogenisierung von Zell-Lysaten und anschließende direkte Isolierung von poly A⁺ mRNA aus HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen, die auf einer 10 cm Zellkulturschale bis zu konfluentem Wachstum (ca. 1×10^7 Zellen) herangezogen worden sind, wurden in 600 μ m OL direkt auf der Zellkulturschale lysiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber auf einer Seite der Schale gesammelt, und auf eine Vorrichtung gemäß der vorliegenden Patentanmeldung pipettiert. Im Inneren der Vorrichtung wurden zwei Schichten aus CELLPOR PE Filterplatten von 200 μ m und 35 μ m Porengröße so angeordnet, daß sich die Schicht mit der geringeren Porengröße in Richtung der Auslaßöffnung befand. Die Vorrichtung wurde in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß platziert. Anschließend wurde das viskose Lysat durch die Vorrichtung 3 min bei voller Geschwindigkeit in einer herkömmlichen Tischzentrifuge (ca. 14.000 bis 18.000 g) zentrifugiert. Das so erhaltene nicht-viskose Lysat wurde mit 1.200 μ m DB versetzt und 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit 35 μ l einer Oligotex Suspension versetzt und für 10 min inkubiert. Anschließen wurden die mRNA: Oligotex Komplexe pelletiert, und zweimal in 600 μ l OW durch Resuspendieren und Zentrifugieren gewaschen. Die mRNA wurde dann in Wasser von den Oligotex-Partikeln eluiert, und nach Zentrifugation und Pelletierung der Latexpartikel als gereinigte mRNA-Fraktion in ein neues Mikrozentrifugengefäß überführt.

Beispiel 2

Steigerung der Amplifikationseffizienz in der PCR-Reaktion durch Scherung der DNA

Genomische DNA mit einer durchschnittlichen Größe von 100 kb wurde aus HeLa-Zellen gemäß der Prozedur in "Current

Protocols in Molecular Biology" (Ausubel et al., Wiley and Sons, Boston, Vol. 1, Seiten 2.2.1 bis 2.2.3) isoliert. In Parallelansätzen wurde die DNA in Tris-Puffer über eine Vorrichtung gemäß der vorliegenden Patentanmeldung mit jeweils einer Schicht aus CELLPOR PE Filterplatten von 200 μm , 50 μm , 35 μm und 5 μm Porengröße 2 min zentrifugiert. Im PCR-Ansatz wurden anschließend jeweils 1 μg der unterschiedlich gesicherten DNA sowie nicht-gesicherte DNA eingesetzt, um ein 140 bp Fragment des Globin-Gens zu amplifizieren. In der PCR-Reaktion wurden, bei gleicher Anzahl an Zyklen, mit gesicherter DNA größere Ausbeute an Amplifikat erzielt als mit ungesicherter DNA.

Beispiel 3

Isolierung von RNA aus einem Polyacrylamid-Gelstück nach Zerkleinerung des Polyacrylamidgels

Auf einem denaturierenden 5 %igen Polyacrylamid-Harnstoffgel wurde in vitro transkribiert RNA aufgetragen, um das "full-length" Transkript von kürzeren Transkripten zu trennen. Nach Ethidiumbromid Färbung der RNA wurde die entsprechende, 360 Basen große Bande ausgeschnitten, und auf eine Vorrichtung gemäß der vorliegenden Patentanmeldung mit einer Schicht aus CELLPOR PE Filterplatten von 200 μm überführt. Dann wurden 500 μl TE-Puffer auf die Vorrichtung pipettiert. Anschließend wurde für 3 min bei voller Geschwindigkeit in einer herkömmlichen Tischzentrifuge (ca. 14.000 bis 18.000 g) zentrifugiert. Das so zerkleinerte Gelstückchen wurde erneut auf eine Vorrichtung mit einer Schicht aus einer CELLPOR PE Filterplatte mit 1 μm Porengröße überführt, um die kleinen Polyacrylamid-Harnstoffgelstücke von der Flüssigkeit zu trennen. Die wäßrige Fraktion im Auffanggefäß wurde dann Phenol/Chloroform extrahiert. Die obere, wäßrige Phase wurde abpipettiert, und die darin gelöste RNA mit LiCl (Endkonzentration 3 M) für 3 Stunden bei 20°C gefällt. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 70 % Alkohol gewaschen, abzentrifugiert

und unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde die RNA in TE gelöst.

Beispiel 4

Isolierung von RNA aus Weichgewebe nach Homogenisierung des Gewebes über die erfindungsgemäße Vorrichtung.

Zusammensetzungen der in den Beispielen 4 und 5 benutzten Lösungen

- R1: 3,5 M Guanidin-Isothiocyanat, 25 mM Na-Citrat pH 7,0,
1% β -Mercaptoethanol
R2: 900 mM GTC, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% Ethanol
TE: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 80% Ethanol

20 mg Brustgewebe wurden auf eine erfindungsgemäße Vorrichtung gelegt und 350 μ l Lysepuffer R1 dazu pipettiert. Im Inneren der Vorrichtung wurden 2 Schichten aus CELLPOR PE Filterplatten von 200 μ m und 50 μ m Porengröße so angeordnet, daß sich die Schicht mit der geringeren Porengröße in Richtung der Auslaßöffnung befand. Die Vorrichtung wurde in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß plaziert. Anschließend wurde das viskose Lysat durch die Vorrichtung 3 min bei voller Geschwindigkeit in einer herkömmlichen Tischzentrifuge (ca. 14.000 bis 18.000 g) zentrifugiert. Das so erhaltene nicht-viskose Lysat wurde mit 350 μ l 70% Ethanol versetzt und gemäß P 44 04 361 auf eine RNeasy Spin Säule, die in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß hängt, pipettiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 8.000 x g für 15 sec in einer Standardtischzentrifuge. Die RNeasy Spin Säule wird in ein neues 2 ml Gefäß transferiert, und mit 700 μ l Waschpuffer R2 gewaschen (15 sec Zentrifugation bei 8.000 x g). Daraufhin wird die Säule gleichermaßen zweimal mit 500 μ l Waschpuffer TE gewaschen. Zur Elution der RNA wird die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, 50 μ l DEPC-behandeltes Wasser werden direkt auf die Membran der Spin-

säule pipettiert, und die RNA anschließend durch 1 min Zentrifugation bei 8.000 x g aufgefangen.

Beispiel 5

Isolierung von RNA aus pflanzlichen Zellen und Geweben nach Zentrifugation über die erfindungsgemäße Vorrichtung.

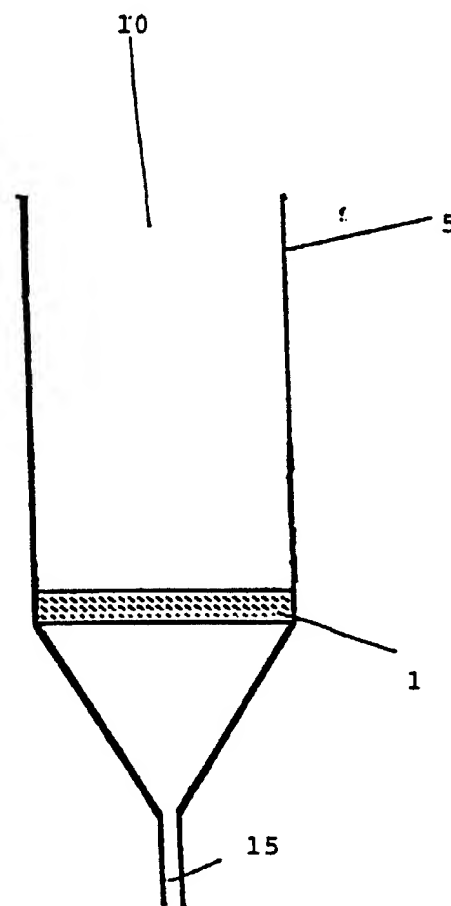
100 mg Blattgewebe von Pelagonien wurden unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver verrieben. Anschließend wurde das Pulver in 450 μ l Lysepuffer R1 lysiert und das so erhaltene Lysat auf die erfindungsgemäße Vorrichtung pipettiert. Im Inneren der Vorrichtung wurden 2 Schichten aus CELLPOR PE Filterplatten von 200 μ m und 50 μ m Porengröße so angeordnet, daß sich die Schicht mit der geringeren Porengröße in Richtung der Auslaßöffnung befand. Die Vorrichtung wurde in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß plaziert. Anschließend wurde das viskose Lysat durch die Vorrichtung 3 min bei voller Geschwindigkeit in einer herkömmlichen Tischzentrifuge (ca. 14.000 bis 18.000 g) zentrifugiert. Das so erhaltene nicht-viskose Lysat wurde mit 225 μ l 100% Ethanol versetzt und gemäß P 44 04 361 auf eine RNeasy Spin Säule, die in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß hängt, pipettiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 8.000 x g für 15 sec in einer Standardtischzentrifuge. Die RNeasy Spin Säule wird in ein neues 2 ml Gefäß transferiert, und mit 700 μ l Waschpuffer R2 gewaschen (15 sec Zentrifugation bei 8000 x g). Daraufhin wird die Säule gleichermaßen zweimal mit 500 μ l Waschpuffer TE gewaschen. Zur Elution der RNA wird die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, 50 μ l DEPC-behandeltes Wasser werden direkt auf die Membran der Spin-säule pipetiert, und die RNA anschließend durch 1 min Zentrifugation bei 8.000 x g aufgefangen.

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zum Zerkleinern hochmolekularer Strukturen, insbesondere hochmolekularer Nucleinsäurestrukturen in Proben, wobei die zu zerkleinernden hochmolekularen Strukturen eine Einrichtung passieren, die mit mindestens einer porösen Schicht versehen ist, deren Porengröße in Passierichtung der zu zerkleinernden Strukturen, durch die poröse Schicht gesehen, abnimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die poröse Schicht aus mindestens zwei Schichten aufgebaut wird, deren mittlere Porengröße unterschiedlich ist, wobei die in Fließrichtung der Proben gesehene erste Schicht eine mittlere Porengröße bis zu dem 6-fachen der Porengröße der zweiten Schicht aufweisen kann und die zweite Schicht eine mittlere Porengröße größer als 10 µm besitzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei das zu zerkleinernde System eine viskose Lösung ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die viskose Lösung ein Zell- und/oder Gewebelysat oder eine zur Trennung von Nucleinsäuren verwendete Matrix, wie Polyacrylamidgele ist.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Scherung von Nucleinsäuren wie genomischer DNA, zur Homogenisierung genomischer DNA oder anderer hochmolekularer Verbindungen enthaltender Lösungen.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das zu zerkleinernde System (Probe) auf der Einrichtung mit poröser Schicht angeordnet wird und auf der Probenseite mit mechanischer Einwirkung, wie Überdruck oder erhöhter Schwerkraft und/oder auf der probenabgewandten Seite durch Unterdruck, die Schicht der Einrichtung passiert.

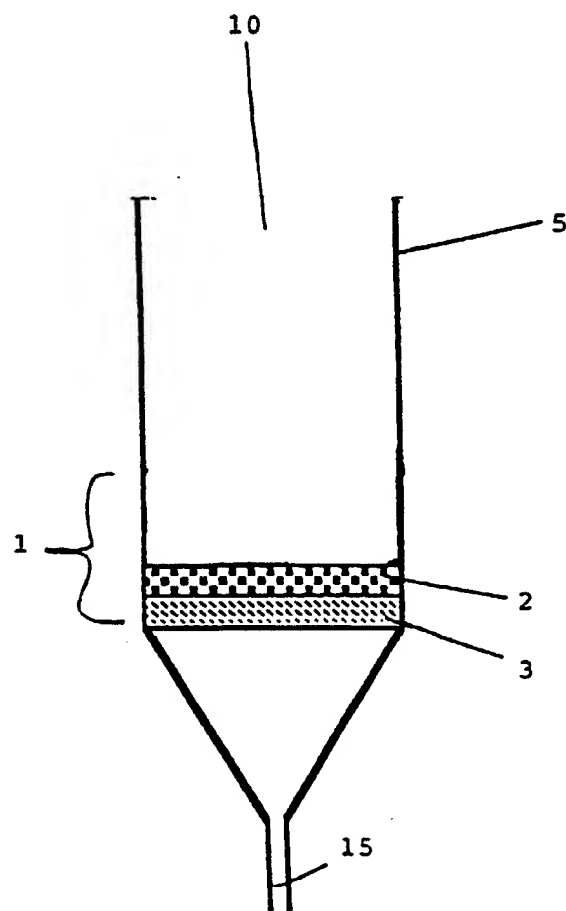
7. Vorrichtung mit einer Einlaß- (10) und Auslaßöffnung (15), mit mindestens einer im Lumen eines Hohlkörpers (5) angeordneten Einrichtung aus einer Schicht (1) zur Zerkleinerung hochmolekularer Strukturen, wobei die mittlere Porengröße der Schicht (1) in Passierichtung der zu zerkleinernden Strukturen, durch die poröse Schicht (1) gesehen, abnimmt.
8. Vorrichtung nach Anspruch 7, die mindestens zwei Schichten (2, 3) mit in Richtung der Auslaßöffnung (15) abnehmender Porengröße der Schichten (2, 3), zur Zerkleinerung hochmolekularer Strukturen aufweist, wobei die erste Schicht (2) eine mittlere Porengröße von bis zum 6-fachen der Porengröße der zweiten Schicht (3) aufweist und die zweite Schicht (3) eine Porengröße $> 10 \mu\text{m}$ besitzt.
9. Vorrichtung nach Anspruch 7 und/oder 8, die in einem Zentrifugationsröhrchen (20) angeordnet ist.
10. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei die poröse(n) Schicht(en) aus anorganischen oder polymeren organischen Materialien besteht.
11. Vorrichtung nach Anspruch 10, wobei die poröse(n) Schicht(en) aus Glas- und/oder Metallfritten, zum Aufbau von Membranfiltern geeigneten Materialien, wie Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol, Polytetrafluoroethylen, und/oder Filter aus Metall, Keramik jeweils in Form von Schüttungen oder als gesinterte Strukturen.
12. Verwendung der Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 11 zur Zerkleinerung (Scherung) von genomischer DNA, Homogenisierung von genomischer DNA und/oder Zerkleinerung von Polyacrylamidgelen.
13. Verwendung der Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 11, zur Homogenisierung eines viskosen Systems wie Zell- oder Gewebelysaten.

14. Verwendung der Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 11 zur Probenvorbereitung für die Isolierung von mRNA und Gesamt-RNA.
15. Verwendung der Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 7 bis 11, und 13 zur Probenvorbereitung für die Isolierung von mRNA und Gesamt-RNA und DNA aus pflanzlichen Zell- und Gewebelysaten.



Figur 1

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)
ISA/EP



Figur 2

BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)
ISA/EP

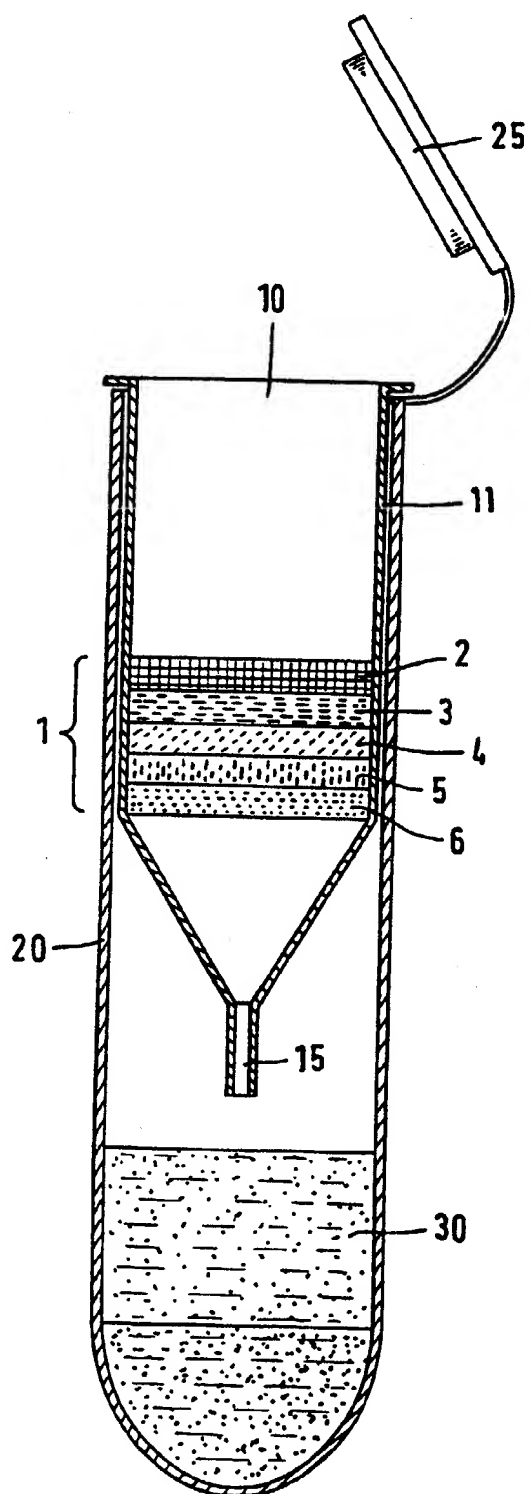


FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

P EP 95/00037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12M3/06 C12M3/08 C12N15/10 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12M C12N C12Q B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 11218 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 10 June 1993 cited in the application see the whole document ----	1-3, 5-15
X	WO,A,92 00132 (COULTER CORPORATION) 9 January 1992 see claims; figures ----	1, 7, 10, 12
A	WO,A,92 07863 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 14 May 1992 cited in the application ----	
A	DE,U,91 12 776 (E. BRENDDEL-MÜLLER) 23 January 1992 ----	

	---/---	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April 1995

Date of mailing of the international search report

19. 05. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bevan, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
EP 95/00037

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,5 114 858 (J.G. WILLIAMS & L. ROSANIO) 19 May 1992 see claims; examples -----	1,3,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

P EP 95/00037

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9311218	10-06-93	DE-A- 4139664 WO-A- 9311221 EP-A- 0616638 EP-A- 0616639 JP-T- 7501222 JP-T- 7501223	03-06-93 10-06-93 28-09-94 28-09-94 09-02-95 09-02-95
WO-A-9200132	09-01-92	US-A- 5076933 AU-B- 654669 AU-A- 8215091 EP-A- 0536297 JP-T- 6507375 US-A- 5221483	31-12-91 17-11-94 23-01-92 14-04-93 25-08-94 22-06-93
WO-A-9207863	14-05-92	DE-A- 4034036 EP-A- 0555270	30-04-92 18-08-93
DE-U-9112776	23-01-92	NONE	
US-A-5114858	19-05-92	US-A- 5330916	19-07-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern sales Aktenzeichen
EP 95/00037

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12M3/06 C12M3/08 C12N15/10 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12M C12N C12Q B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,93 11218 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 10.Juni 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-3,5-15
X	WO,A,92 00132 (COULTER CORPORATION) 9.Januar 1992 siehe Ansprüche; Abbildungen ---	1,7,10, 12
A	WO,A,92 07863 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 14.Mai 1992 in der Anmeldung erwähnt ---	
A	DE,U,91 12 776 (E. BRENDL-MÜLLER) 23.Januar 1992 ---	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24.April 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19.05.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bevan, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
EP 95/00037

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US,A,5 114 858 (J.G. WILLIAMS & L. ROSANIO) 19.Mai 1992 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1,3,5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

EP 95/00037

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9311218	10-06-93	DE-A- 4139664	03-06-93
		WO-A- 9311221	10-06-93
		EP-A- 0616638	28-09-94
		EP-A- 0616639	28-09-94
		JP-T- 7501222	09-02-95
		JP-T- 7501223	09-02-95
WO-A-9200132	09-01-92	US-A- 5076933	31-12-91
		AU-B- 654669	17-11-94
		AU-A- 8215091	23-01-92
		EP-A- 0536297	14-04-93
		JP-T- 6507375	25-08-94
		US-A- 5221483	22-06-93
WO-A-9207863	14-05-92	DE-A- 4034036	30-04-92
		EP-A- 0555270	18-08-93
DE-U-9112776	23-01-92	KEINE	
US-A-5114858	19-05-92	US-A- 5330916	19-07-94